

Title	A Novel DNA Binding Activity is Elevated in Thymocytes Expressing High Levels of H-2Dd after Radiation Leukemia Virus Infection
Author(s)	信永, 敏克
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38486
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	信 永 敏 克
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 8 2 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 5 月 11 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	A Novel DNA Binding Activity is Elevated in Thymocytes Expressing High Levels of H-2 D ^d after Radiation Leukemia Virus Infection (Radiation Leukemia Virus 感染後の H-2 D ^d 呈示胸腺細胞における DNA 結合能の増加)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 澤 修 (副査) 教 授 濱 岡 利 之 教 授 野 村 大 成

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

父親よりの遺伝子を有する胎芽、胎児、絨毛は、母体にとって semiallograft であり、拒絶されずに妊娠が維持されるためには、内分泌、免疫、代謝、その他の多くの機構が関与している。母体との接点である胎盤にも、胎芽、胎児を母体の免疫的攻撃から防御するいくつかの機構が存在する。特に、絨毛の cytotrophoblast には、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) の class I 抗原のみ存在し、母体側が免疫応答を誘起し、細胞傷害的な反応ではなく、妊娠維持に関与していると推察されている。そのため、MHC class I の発現調節機構の解析は、妊娠維持機構の解明にとって極めて重要である。本研究においては、ウイルス感染後に MHC class I 抗原を発現した胸腺細胞を用いて MHC class I 遺伝子発現調節機構の解析を行った。

[方法ならびに成績]

Radiation leukemia virus(RadLV)感染後、RadLV 耐性マウスでは、RadLV 感染胸腺細胞表面に MHC class I H-2 D^d 抗原の発現が増加し、免疫応答により感染細胞は排除される。この系を用い、RadLV 耐性の B10. T (6 R) マウスの RadLV 感染胸腺細胞と正常胸腺細胞を比較することにより、H-2 D^d 抗原発現の調節機構の解析を行った。

RadLV を胸腺に注入後、平均17日目に胸腺を摘出し、胸腺細胞を収集した。FACS 解析により、RadLV 感染細胞表面の H-2 D^d 抗原の発現の増加が、また、ノザンプロットングにより RadLV 感染細胞中の H-2 RNA の増加が認められた。次いで、胸腺細胞の核を抽出し、転写中の mRNA について検討するために、run-off 解析を施行した。RadLV 感染細胞では、H-2 遺伝子の転写が活性化しており、転写の活性化が、H-2 RNA の増加および H-2 D^d 抗原発現の原因であることが示された。

DNA から mRNA への転写は、転写調節因子が遺伝子近傍にある転写制御配列と結合することにより制御されている。この DNA-蛋白相互作用を検討するために、胸腺細胞より核蛋白を抽出し、H-2 D^d 遺伝子近傍の DNA と結合させ、ゲル移動度解析を行った。RadLV 感染細胞の核蛋白は、H-2 D^d 遺伝子の -158~+18bp の DNA と強

く結合し、この部位に転写制御配列が存在することが示された。より正確に転写制御配列を決定するために、フットプリンティング解析を行ったところ、感染細胞の核蛋白は、H-2 D^d 遺伝子の-105~-90bp の DNA (ゲノミック配列) と強く結合した。ゲノミック配列は、強力な転写活性化因子である AP-1 結合配列と近似した塩基配列を含んでいるため、ゲノミック配列と AP-1 結合配列のオリゴヌクレオチドを合成し、AP-1 を多く含む HeLa 細胞より抽出した核蛋白、および RadLV 感染細胞の核蛋白との結合を比較検討した。ゲル移動度解析により、ゲノミック配列には RadLV 感染細胞の核蛋白が強く結合し、AP-1 結合配列は、HeLa 細胞の核蛋白 (AP-1) が強く結合することが示された。また、核蛋白-DNA 複合体の移動度も異なり、RadLV 感染細胞の H-2 D^d 転写活性化因子は、AP-1 ではなく AP-1 より小さい蛋白であることが推察された。AP-1 は、癌遺伝子蛋白 Jun, Fos の 2 量体であるが、RadLV 感染細胞では、核蛋白、RNA 共に、Jun, Fos の発現は認められなかった。ゲノミック配列に結合する蛋白の分子量を決定するために、UV-cross-linking 解析を行った。HeLa 細胞では、39KDa の結合蛋白 (Jun) が認められ、RadLV 感染細胞では、27KDa の結合蛋白が認められた。AP-1 ファミリーとして、現在まで数種類の遺伝子が同定されているが、それらの蛋白とは異なる分子量であることが証明された。

RadLV 感染細胞における、MHC class I, H-2 D^d 遺伝子の転写制御配列は、-105~-90bp に存在し、その中央部分には、AP-1 結合配列と似た (TGACGCG) という配列があり、この配列は種を越えて、MHC class I 遺伝子に保存されており、極めて重要な class I の転写制御配列であることが推察された。また、転写調節因子は、AP-1 ファミリーではなく、未知の 27KDa の核蛋白であることが示された。

[総括]

- (1) Radiation Leukemia Virus 感染後、ウイルス耐性胸腺細胞では、MHC class I, H-2 の転写活性化により、mRNA が増加し、H-2 D^d 抗原の発現が増加する。
- (2) H-2 D^d 遺伝子の -105~-90 の配列に、27KDa の未知の核蛋白が結合する。
- (3) -105~-90 の配列の中の (TGACGCG) という配列は、種を越えて MHC class I 遺伝子近傍に保存されており、極めて重要な MHC class I の転写制御配列であると推察された。

論文審査の結果の要旨

Radiation Leukemia Virus (RadLV) 感染後、RadLV 耐性マウスでは、RadLV 感染胸腺細胞表面に MHC class I H-2 D^d 抗原の発現が増加し、免疫応答により感染細胞は排除される。この系を用い、RadLV 耐性の B10. T (6R) マウスの RadLV 感染胸腺細胞と正常胸腺細胞を比較することにより、H-2 D^d 抗原発現の調節機構の解析を行ったところ、RadLV 感染細胞では、H-2 遺伝子の転写が活性化しており、転写の活性化が、H-2 RNA の増加および H-2 D^d 抗原発現の原因であることが示された。

また、H-2 D^d 遺伝子の転写制御配列は、-105~-90bp に存在し、その中央部分には、AP-1 結合配列と似た (TGACGCG) という配列があり、この配列は種を越えて、MHC class I 遺伝子に保存されており、極めて重要な class I の転写制御配列であることが推察された。また、転写調節因子は、AP-1 ファミリーではなく、未知の 27 KDa の核蛋白であることが示された。

よって、本論文は学位を授与されるに値する研究であることを確認した。